



# **TRPA1-PROTEIININ TUOTTO JA KARAKTERISOINTI WESTERN BLOT -MENETELMÄLLÄ**

Meiju Kukkonen

Kehittämistehtävä  
Kesäkuu 2010  
Solu- ja molekyylibiologian  
erikoistumisopinnot  
Tampereen ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Solu- ja molekyylibiologian erikoistumisopinnot

KUKKONEN, MEIJU:

TRPA1-proteiinin tuotto ja karakterisointi Western blot -menetelmällä

Kehittämistehtävä 31 s.

Kesäkuu 2010

---

Ionikanavat ovat solukalvon läpäiseviä proteiineja, jotka kuljettavat ioneja soluun ja solusta ulos. Solun sisäistä kalsiumioni-pitoisuutta säätelevät muun muassa TRP-ionikanavat (transient receptor potential channel). TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) on TRP-ionikanavaperheen uusi tunnistettu jäsen, jota esiintyy esimerkiksi hermosoluissa, ihon keratinosyyteissä ja synoviasoluissa. TRPA1:n on muun muassa todettu välittävän formaliini-indusoitua kipua sekä toimivan hengitysteiden hermosoluissa ärsykeitä aistivana ionikanavana, joten sen uskotaan olevan potentiaalinen vaikutuskohde kivun ja yskän sekä mahdollisesti keuhkosairauksien lääkehoidossa.

Kehittämistehtävän tavoitteena oli tuottaa TRPA1-proteiinia ja karakterisoida tuotettu proteiini Western blot –menetelmällä. TRPA1-geenin sisältävää plasmidia monistettiin kompetenteissa *E. coli* –soluissa, jonka jälkeen eristetylle plasmidi-DNA:lle tehtiin restriktioanalyysi digestoimalla plasmidi-DNA ja analysoimalla digestiotuotteet agarosigeelielektroforeesilla. TRPA1-proteiinin tuottamiseksi plasmidi-DNA transfektoitiin eukaryoottisoluihin, joista tuotettu TRPA1-proteiini eristettiin ja analysoitiin Western blot –menetelmällä.

TRPA1-geenin sisältävää plasmidi-DNA:ta onnistuttiin monistamaan bakteerisoluihin ja restriktiokartoituksella plasmidin todettiin olevan oikean kokoista sekä vahingoittumatonta. Plasmidi-DNA:ta transfektoitiin eukaryoottisoluihin ja transfektiotehokkuus fluoresoivalla transfektioindikaattorilla määritettynä oli hyvä. Transfektoidut eukaryoottisolut ilmensivät TRPA1-proteiinia, joka osoitettiin Western blot –määrityksellä. Kehittämistehtävä toteutettiin osana laajempaa TRPA1-tutkimusta, jossa voidaan hyödyntää kehittämistehtävässä saatuja tuloksia ja TRPA1-proteiinia sisältäviä näytteitä tutkimuksen edetessä. TRPA1:n ilmentymistä on tarkoitus tutkia myös lähetti-RNA tasolla reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR (RT-qPCR) –menetelmällä ja TRPA1:n funktiota on tarkoitus tutkia solumalleissa.

---

Asiasanat: Plasmidi-DNA, transfektio, TRPA1, Transient receptor potential ankyrin 1, Western blot.

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	4
2 TEOREETTINEN TAUSTA.....	5
2.1 Kipu.....	5
2.2 TRP-ionikanavat.....	5
2.3 TRPA1.....	6
2.4 Menetelmät.....	8
2.4.1 Plasmidi-DNA:n tuotto ja analysointi.....	8
2.4.2 Rekombinanttiproteiinin tuotto.....	10
2.4.3 Rekombinanttiproteiinin karakterisointi Western blot –menetelmällä.....	12
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	15
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	16
4.1 TRPA1 plasmidin tuotto.....	17
4.1.1 Transformaatio <i>E. coli</i> –soluihin.....	17
4.1.2 Plasmidi-DNA:n eristys, puhdistus ja pitoisuuden määrittäminen.....	17
4.1.3 Plasmidi-DNA:n restriktioanalyysi.....	18
4.2 TRPA1-proteiinin tuotto.....	18
4.2.1 Transfektointi HEK-293-soluihin.....	19
4.2.2 Transfektio tehokkuuden arviointi.....	19
4.2.3 Proteiinien eristys ja proteiinipitoisuuden määrittäminen.....	20
4.3 Karakterisointi Western blot –menetelmällä.....	20
4.3.1 TRPA1:n ekspression määrittäminen.....	21
4.3.2 Aktiinin ekspression määrittäminen.....	22
5 TULOKSET.....	23
5.1 Plasmidi-DNA:n analysointi ja restriktio kartoitus.....	23
5.2 Transfektio tehokkuuden arviointi fluoresoivalla indikaattorilla.....	24
5.3 TRPA1-proteiinin karakterisointi Western blot –menetelmällä.....	25
6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU.....	26
LÄHTEET.....	29

## 1 JOHDANTO

Ionikanavat ovat solukalvon läpäiseviä proteiineja, jotka kuljettavat ioneja solun sisään ja solusta ulos. Ionikanavaproteiinin keskellä on erityinen selektiivinen kanava, joka mahdollistaa tiettyjen ionien, kuten kalsium- tai natriumionien, kulkeutumisen kanavan lävitse. Ionikanavat ovat tärkeitä solujen normaalin toiminnan säätelyn kannalta ja yhdessä solussa voi olla jopa kymmeniä erilaisia ionikanavia. Niillä voi olla merkitystä myös sairauksien synnyssä ja kulussa, minkä vuoksi ne ovat kiinnostava kohde myös lääketutkimuksen kannalta. Ihmisen genomi koodaa arviolta noin 200 erilaista ionikanavaa. Ionikanaviin vaikuttavia lääkkeitä käytetään muun muassa sydänsairauksien, kivun ja epilepsian hoidossa.

TRPA1-ionikanava on tutkimuksissa osoittautunut lupaavaksi uudeksi vaikutuskohteeksi kivun hoidossa sekä astman ja muiden keuhkosairauksien lääkehoidossa. Kehittämistehtävän tavoitteena oli tuottaa TRPA1-proteiinia ja karakterisoida tuotettu proteiini Western blot –menetelmällä. Karakterisoidusta TRPA1-proteiinista oli tarkoitus saada TRPA1-tutkimuksessa tarvittava positiivinen kontrollinäyte tuleviin Western blot –määrittelyihin. TRPA1-proteiinia ilmentäviä soluja on tulevaisuudessa tarkoitus käyttää TRPA1:n funktion tutkimisessa. Kehittämistehtävä toteutettiin osana laajempaa TRPA1-tutkimusta kevään 2010 aikana Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen Immunofarmakologian tutkimusryhmässä, jossa tutkitaan tulehdukseen ja tulehduskipuun liittyviä mekanismeja sekä tulehdusreaktiota hillitseviä lääkkeitä.

Kehittämistehtävän ohjaajina toimivat FT Riina Nieminen, LT Riku Korhonen ja professori Eeva Moilanen (Tampereen yliopisto) sekä FT Tuuli Välineva (Tampereen ammattikorkeakoulu).

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Kipu

Kipu on epämiellyttävä tunne, johon voidaan liittää todellinen tai potentiaalinen kudsvaurio. Kipu voidaan luokitella sen aiheuttajan mukaan kolmeen kategoriaan: 1. Kipuaistin reseptorin aiheuttamaan kipuun, jossa reseptori reagoi kipuärsykkeeseen ja kipu välittyy neuronaalista reittiä, 2. Neuropaattiseen kipuun, jossa hermorakenteisiin syntynyt vaurio häiritsee hermosolujen kykyä välittää tietoa aivoihin ja 3. Psykologiseen kipuun, jossa kivulla ei ole selkeää fysiologista alkuperää. Kipu voidaan luokitella myös sen keston mukaan akuutiksi tai krooniseksi kivuksi. Akuutti kipu on suoraan kivunaiheuttajasta johtuvaa ja toimii varoitussignaalina, kun taas krooninen kipu on jatkuvaa vielä kivunaiheuttajan poistumisen jälkeen. (Nilius ym. 2007, 182.) Tulehduksellinen kipu on tulehduksen tai kudsvaurion aiheuttamaa ja sen ominaisuuksiin kuuluu vaurioituneen kudoksen ja sen viereisten kudosten kipuyliherkkyys. Kun normaalisti kipua aiheuttamaton ärsyke aiheuttaa kipua tulehduksen yhteydessä, kipuyliherkkyyttä kutsutaan allodynaksi. Hyperalgesia puolestaan on yliherkkyystila, jossa haitallinen ärsyke aiheuttaa tavallista suuremman kipureaktion. Yksi tämän ilmiön mekanismeista on ionikanavien herkistyminen. (Wang ym. 2008, 1242.)

### 2.2 TRP-ionikanavat

Solun sisäinen kalsiumpitoisuus  $[Ca^{2+}]$  ja sen muutokset vaikuttavat moniin solun toimintoihin, kuten geenien ilmentymiseen, välittäjäaineiden vapautumiseen, solun jakautumiseen ja kasvuun, lihassolujen supistumiseen sekä apoptoottiseen solukuolemaan. Solun sisäistä  $Ca^{2+}$ -pitoisuutta säätelevät muun muassa TRP (transient receptor potential) –kationi-ionikanavat, joita esiintyy lähes kaikissa kudoksissa ja solutyypeissä. (Nilius ym. 2007, 165 -173.) TRP-ionikanavat ovat osallisina monissa aistimalleissa, kuten maku-, haju-, näkö, kuulo- ja tuntoaistimuksessa sekä lämmön ja kivun aistimisessa. Monisoluiisten organismien ajatellaan tämän vuoksi aistivan ympäristöään TRP-ionikanavien kautta solujen reagoidessa ympäristön muutokseen. (Latorre 2009, 228.)

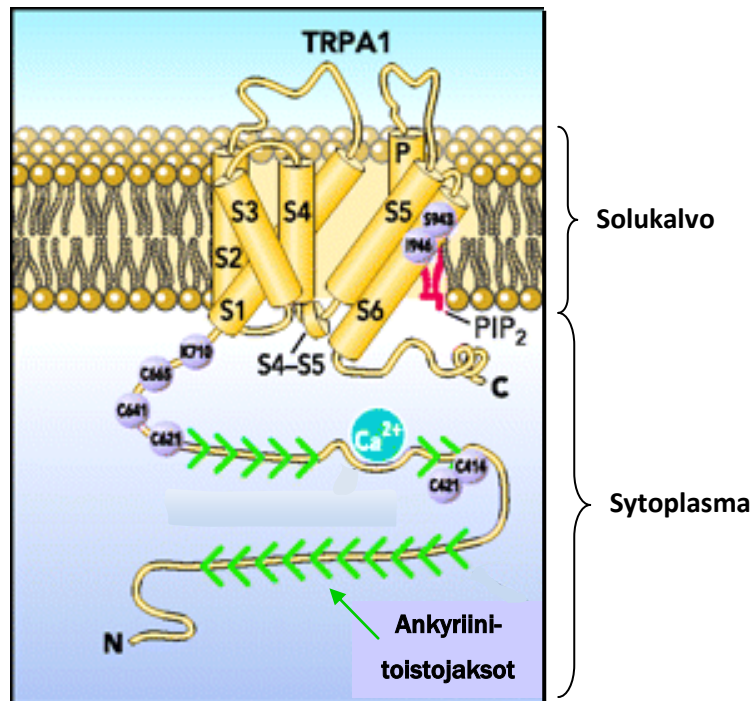
TRP-ionikanavien uskotaan liittyvän moniin sairauksiin, sillä ionikanavien määrä eri kudoksissa korreloi useiden sairauksien oireisiin. TRP-ionikanavat ovat myös mukana joissakin koko elimistöä koskettavissa sairauksissa, sillä ne ovat monien ärsykkeiden, ksenobioottisten myrkkyjen sekä tulehduksessa vapautuvien tekijöiden vaikutuskohde. Useissa tulehdus- ja sairaustiloissa, kuten hermostoa rappeuttavissa sairauksissa sekä sydän- ja hengityssairauksissa ionikanavien toiminta voi olla epänormaalisti säädeltyä. (Nilius ym. 2007, 165 -173.)

Nisäkkäillä esiintyy yli kolmekymmentä erilaista TRP-ionikanavaa, jotka voidaan jakaa kuuteen alakategoriaan aminohapposekvenssien homologian perusteella: TRPV (vanilloidi), TRPC (kanonikaali), TRPM (melastatiini), TRPML (mukolipiini), TRPP (polykystiini) sekä TRPA (ankyriini). Lisäksi on tunnistettu seitsemäs alakategoria TRPN (ei-mekanoreseptori potentiaali C, no mechanoreceptor potential C, NOMPC), jota ei ole havaittu esiintyvän nisäkkäillä. Alakategoriat on nimetty kyseisiin TRP-kanaviin vaikuttavien tekijöiden tai TRP-kanavien tehtävän perusteella. Esimerkiksi TRPM eli melastatiini on oletettavasti kasvaimen kehittymistä estävä proteiini, jonka määrä melanoomasoluissa on vähentynyt. (Pedersen ym. 2005, 233 – 240.)

### 2.3 TRPA1

Uusin tunnistettu TRP-ionikanavien alakategoria on TRPA, jonka ainoa nisäkkäissä tunnettu jäsen on TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1). TRPA1 on rakenteeltaan kuusi kertaa solukalvon läpäisevä ionikanava, jonka ominaispiirteenä on aminohappoketjun aminopäässä sijaitsevat lukuisat ankyriinitoistojaksot (kuvio 1, s. 7). (Bessac & Jordt 2008, 361 – 362.) Alunperin TRPA1:n havaittiin esiintyvän hermosoluissa ja neuroneissa (Nilius ym. 2007, 171). TRPA1:tä on kuitenkin löydetty myöhemmin myös mast-soluista (Yu ym. 2009, 34 – 42), ihon keratinosyyteistä (Atoyan ym. 2009, 2312 – 2315) sekä synoviasoluista (Kochukov ym. 2009, 424 – 432). TRPA1:tä esiintyy myös sisäkorvan hiussoluissa ja sen arvellaan osallistuvan mekaanisen muutoksen eli esimerkiksi kosketuksen tai kuulon aistimiseen. TRPA1:n uskotaan toimivan myös lämmön sekä kivun aistimisessa. (Zhang ym. 2008, 605.) TRPA1:tä aktivoivia yhdisteitä sisältävä sinappiöljy aiheuttaa normaalisti hiirillä neurogeenisen tulehduksen aiheuttaen lämpö- ja mekaanista hyperalgesiaa, kun taas

TRPA1 poistogeenisissä hiirissä yliherkkyys on kadonnut joko kokonaan tai osittain (Nilius ym. 2007, 184).



KUVIO 1. TRPA1-monomeerin rakenne. TRPA1-ionikanava koostuu neljästä identtisestä monomeeristä, joista kukin sisältää kuusi solukalvon läpäisevää osiota (S1-S6) ja solun sisäisen ankyriinitoistojakson (kuvassa vihreällä) aminohappoketjun aminopäässä (N). (Bessac & Jordt 2008 kuvaa mukaillen Kukkonen 2010.)

Kivun ja kipulääkkeiden vaikutusten tutkimiseen eläinmalleissa käytetään yleisesti formaliini-mallia, jossa laimennettua formaliiniliuosta injisoidaan jyräjän tassuun. Formaliini aiheuttaa tassussa kipuvasteen, jota voidaan tutkia muun muassa seuraamalla eläimen käyttäytymistä. Formaliinin aiheuttamaa kipua välittää tutkimusten mukaan TRPA1-ionikanava, sillä formaliini ei aiheuta kipuvastetta TRPA1 poistogeenisissä hiirissä. TRPA1 on siis potentiaalinen vaikutuskohde uusille kipulääkkeille. (McNamara ym. 2007, 13525 – 13528.)

TRPA1 toimii hengitysteiden hermosoluissa ärsykeitä aistivana ionikanavana, jota aktivoivat yleiset astman aiheuttajat kuten tupakansavu, aldehydit, kloriini ja tuoksut. Astma on keuhkoputkien krooninen tulehdussairaus, jonka syntyyn ja taudin kulkuun vaikuttavat hengitysteiden altistuminen allergeeneille ja kemiallisille ärsykeille. Tutkimusten mukaan TRPA1:llä on tärkeä merkitys hengitysteiden

immuunijärjestelmän ja hermoston yhdistävänä tekijänä, jolloin se säätelee astmaattisen hengitystietulehduksen etenemistä ärsykealtistuksen jälkeen. TRPA1 poistogeenisissä hiirissä allergeenien indusoiman leukosyyttien kertymisen hengitysteihin, hengitysteiden lisääntyneen reagoinnin ärsykkeisiin, liman erityksen sekä sytokiinien ja kemokiinien tuoton on todettu olevan vähäisempää kuin normaaleilla hiirillä. TRPA1 vaikuttaa olevan tärkeä neuronaalinen välittäjä allergisessa hengitystietulehduksessa ja voi siis olla lupaava kohde astman lääkehoidossa. (Caceres ym. 2009, 9099 - 9102.)

TRPA1-kanavaa aktivoi muun muassa hengitysteitä ärsyttävä hypokloriitti. TRPA1 poistogeenisillä hiirillä hypokloriitin aiheuttamat kipuvasteet ja vaikutukset hengitykseen ovat lievempiä kuin normaaleilla hiirillä, joten TRPA1:n on todettu olevan tärkeä kemiallinen aistireseptori hapettaville aineille. (Bessac ym. 2008, 1899 – 1900.) Tupakointi aiheuttaa hengitysteissä akuutin neurogeenisen tulehduksen, joka johtuu tupakansavun ainesosien ja TRPA1:n välisestä reaktiosta (Bessac & Jordt 2008, 362). TRPA1 aktivoituu myös nikotiinin vaikutuksesta ja välittää nikotiinin aiheuttamaa ärsytystä (Talavera ym. 2009, 1293 -1298).

## 2.4 Menetelmät

### 2.4.1 Plasmidi-DNA:n tuotto ja analysointi

Plasmidi-DNA:n eristys ja puhdistus koostuu yleensä kolmesta vaiheesta: Transformoitujen bakteerien kasvatuksesta, bakteerien keräämisestä ja hajotuksesta sekä plasmidi-DNA:n puhdistuksesta (Sambrook & Russell 2001, 1.16 – 1.17). Bakteereita ja erityisesti *E. coli* -bakteeria käytetään erilaisissa tuottosysteemeissä muun muassa sen vuoksi, että DNA:n eristäminen bakteereista on helppoa niiden vähärakenteisen soluseinän ja solukalvon vuoksi. *E. coli*:lla on sekä genomista että plasmidi-DNA:ta, jotka voidaan erottaa toisistaan kokonsa perusteella. (Clark & Pazdernik 2009, 60.)

Jotta plasmidi-DNA:n koodaamat geenit voisivat ilmentyä ja plasmidi replikoitua bakteerisolussa, plasmidin on läpäistävä bakteerisolun solukalvo. Plasmidi-DNA ei läpäise bakteerin solukalvoa sellaisenaan, vaan se tarvitsee kemiallista tai fysikaalista apua, jota kutsutaan transformaatioksi. Kemiallisessa transformaatiossa *E. coli*



-bakteerisoluja käsitellään yksinkertaisilla suolaliuoksilla, jolloin ne saavuttavat kompetentin eli vastaanottavaisen tilan. Solujen ollessa kompetentteja, DNA-molekyylit voivat läpäistä niiden solukalvon. Useimmat kemialliset transformaatiomenetelmät perustuvat menetelmään, jossa soluja käsitellään ensin jääkylmällä suolaliuoksella ja sen jälkeen lämmitetään solut hetkeksi +37 °C:seen tai +42 °C:seen. Tämän käsittelyn seurauksena DNA tuntemattomalla mekanismilla pääsee solun sisään. (Sambrook & Russell 2001, 1.24 – 1.25.)

Rekombinanttiplasmidin sisältävien bakteerien erottaminen muista bakteerisoluista voidaan tehdä usealla menetelmällä riippuen bakteerisolujen ja rekombinanttiplasmidin ominaisuuksista. Tällaisia menetelmiä ovat muun muassa selektiomarkkereiden käyttö,  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuden havaitseminen eli sinivalkoseulonta, *in situ* hybridisaatio tai pesäke-PCR. Selektiomarkkereilla tarkoitetaan plasmidin tuomia ominaisuuksia, kuten antibioottiresistenssi, jonka bakteerisolut saavat ottaessaan plasmidin sisäänsä. Vain harvoissa tapauksissa rekombinanttiplasmidin transformatio voidaan havaita visuaalisesti tarkastelemalla bakteerisolujen kokoa. Rekombinanttiplasmidin sisältävä bakteerisolu voi olla normaalia pienempi plasmidin ekspressoidessa solun kasvuun vaikuttavaa vierasta proteiinia. Tällaisia proteiineja voivat olla säätely- tai solukalvon proteiinit. (Sambrook & Russell 2001, 1.8, 1.26 -1.28.)

DNA:n puhdistus koostuu yleensä seuraavista vaiheista: Solun tehokkaasta hajoituksesta, tumaproteiinien denaturoinnista, nukleaaalien, kuten DNA:ta pilkkovien DNAaalien inaktivoinnista ja nukleiinihapon suojaamisesta kontaminaatiolta. Kontaminanteja voivat olla muun muassa proteiinit, lipidit, hiilihydraatit tai RNA. (Tan & Yiap 2009, 1.) DNA:n vapauttamiseksi solusta solukalvo hajotetaan yleensä entsymaattisesti käyttäen lysotsyymiä ja solukalvo läpäistään detergentillä. Solun sisäiset komponentit erotetaan uloimmista rakenteista sentrifugoimalla. DNA molekyylit ovat painavampia kuin hajonneet soluseinän fragmentit, joten DNA muodostaa pelletin ja hajonneet fragmentit jäävät liuokseen. Proteiinien saostuksen jälkeen DNA:n joukossa oleva RNA poistetaan käyttäen RNA:ta pilkkovia ribonukleaaseja (RNAasi). (Clark & Pazdernik 2009, 60.)

DNA:ta voidaan pilkkoa erikokoisiksi fragmenteiksi käyttämällä restriktioentsyymejä. Kukin restriktioentsyymi tunnistaa DNA sekvenssistä spesifisen kohdan, johon ne sitoutuvat ja katkaisevat DNA:n molemmista juosteistaan joko samasta kohtaa (tylpät

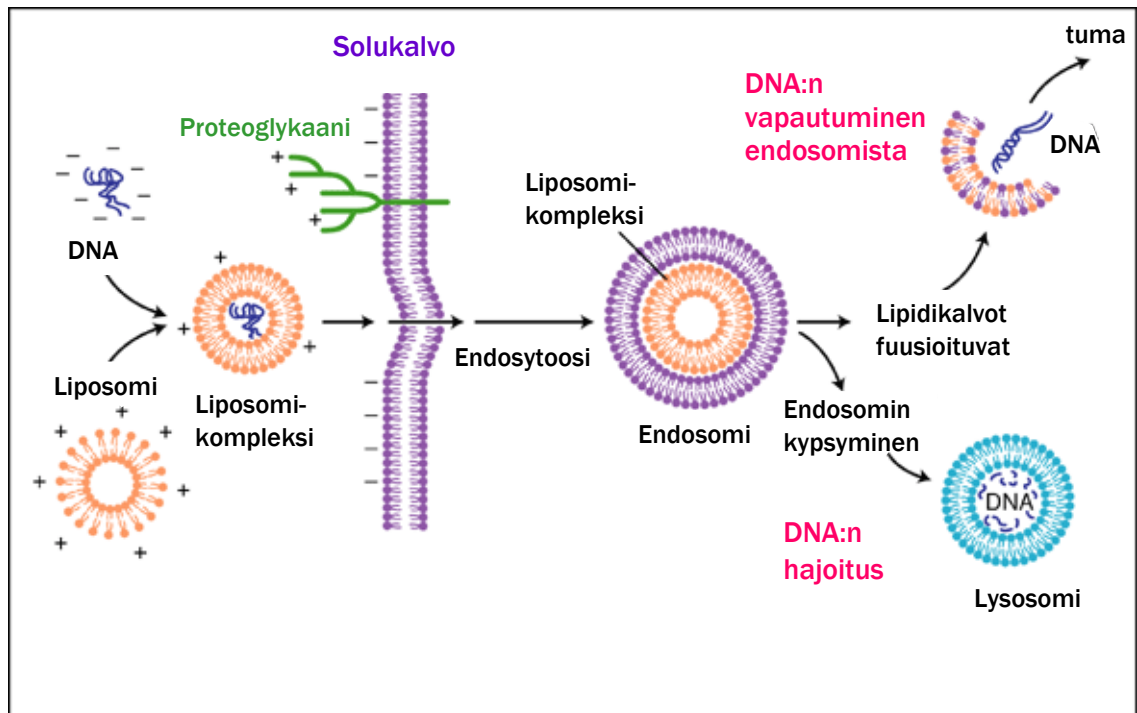
päät, blunt ends) tai hieman eri kohdista (yksijuosteiset päät, sticky ends). (Clark & Pazdernik 2009, 62.) Restriktiokartoituksessa DNA:ta pilkotaan yhdellä tai useammalla restriktioentsyymillä ja syntyneiden fragmenttien kokoa analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla (AGE, agarose gel electrophoresis) (Rapley 2009, 8). Agarosi muodostaa polymerisoituessaan verkkomaisen rakenteen, jossa pienemmät fragmentit kulkeutuvat nopeammin kuin suuret. AGE:ssa negatiivisesti varautunut DNA kulkeutuu sähkökentässä kohti positiivista elektrodia ja erottuu samalla fragmenteikseen kokonsa mukaan. DNA voidaan visualisoida agarosigeeliltä käyttäen etidiumbromidia, joka sitoutuu DNA-juosteiden emästen väliin. DNA:han sitoutunut etidiumbromidi fluoresoi oranssia valoa UV-valolla viritettäessä. Erottuneiden DNA-fragmenttien molekyylipainoa voidaan arvioida käyttämällä molekyylipainostandardia. (Clark & Pazdernik 2009, 60 - 61.)

#### 2.4.2 Rekombinanttiproteiinin tuotto

Rekombinanttiproteiinin tuottamiseksi soluissa proteiinia koodaava geeni täytyy viedä isäntäsolun sisään. Kun isäntäsoluna käytetään eukaryoottisolua, DNA:n viemistä solun sisään kutsutaan transfektioksi. DNA:ta voidaan transfektoida eukaryoottisoluihin joko transientisti tai stabiilisti. Transientin- eli väliaikaisen transfektion tarkoituksena on saada solulinja ilmentämään väliaikaisesti suuressa määrin haluttua geeniä. Transientissa transfektiossa transfektoitu DNA ei välttämättä integroidu isäntäsolun kromosomiin, kun taas stabiilissa eli pysyvässä transfektiossa se integroituu kromosomaaliseen DNA:han. (Sambrook 2001, 16.2.)

Geenien transfektoimiseksi on olemassa useita eri menetelmiä, jotka voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: Biokemiallinen transfektio, fysikaalinen transfektio ja virusvälitteinen transfektio. Fysikaalisia menetelmiä ovat esimerkiksi elektroporaatio ja mikroinjektio. Biokemiallisia menetelmiä ovat muun muassa kalsiumfosfaattisaostus ja lipidivälitteinen transfektio, jota kutsutaan yleisesti lipofektioksi. Lipofektiossa (kuvio 2, s. 11) kationiset lipidit muodostavat DNA:n kanssa kompleksirakenteen edesauttaen sen pääsyä solun sisään. Positiivisesti varautuneet lipidit muodostavat misellirakenteen negatiivisesti varautuneen DNA:n ympärille muodostaen liposomikomplekseja, jotka läpäisevät solukalvon endosytoosin avulla muodostaen endosomeja. Endosomin sisältämä DNA voi vapautua endosomista sen kaksoislipidikalvojen fuusioituessa ja

kulkeutua tumaan, jossa sen koodaamaa transkriptiotuotetta voidaan tuottaa. Kuitenkin vain pieni osa transfektoitavasta DNA:sta kulkeutuu lopulta tumaan. Suurin osa DNA:sta jää solun kalvostojen sisään eikä ole kuljetettavissa tumaan. Lipofektio on kuitenkin muihin transfektiomenetelmiin verrattuna tehokas ja edullinen. (Sambrook 2001, 16.2, 16.50.)



KUVIO 2. Lipofektio. Kationiset lipidit ja transfektoiva DNA muodostavat lipidikompleksin, joka kulkeutuu soluun endosytoosin avulla. Endosomin sisältämä DNA voi vapautuessaan kulkeutua tumaan, jossa sen koodaamaa transkriptiotuotetta voidaan tuottaa. (Parker ym. 2003 kuvaa mukaillen Kukkonen 2010.)

Solujen sisältämien proteiinien määrittämiseksi proteiinit eristään soluista uuttopuskuriin. Uuttopuskuri on yleensä tris- tai fosfaattipohjainen puskuriliuos, johon lisätään soluja hajottavia ja proteiinien rakennetta suojaavia reagensseja. (Walker 2000, 322 – 324.) Nisäkäsolujen fosfolipideistä ja proteiineista koostuva solukalvo on helposti hajoitettavissa (Tan & Yiap 2009, 2 – 6). Uuttopuskuriin lisätyt detergentit, kuten Triton-X ja Tween 20 liuottavat solujen solukalvon proteiineja hajottaen näin solujen rakenteita. Antioksidantit, kuten  $\beta$ -merkaptetanoli estävät proteiinien välisten ja proteiinin sisäisten rikkisiltojen muodostumista. (Walker 2000, 322 – 324.) Soluista vapauttamisen jälkeen proteiinit inaktivoituvat, denaturoituvat ja hajoavat helposti, joten oikeat olosuhteet proteiinieristykselle ovat tärkeitä. Proteiinieritys tehdään

alhaisessa lämpötilassa (+4 °C) ja spesifinen puskuriliuos suojaa proteiineja ympäristön pH-muutoksilta ja ionitasapainon muutoksilta. Proteiinisaantoon vaikuttaa myös veden puhtaus, sillä puhdistamaton vesi sisältää runsaasti proteiineja hajottavia mikro-organismeja ja proteolyttisiä entsyymejä eli proteaaseja. (Tan & Yiap 2009, 2 – 6.) Proteaaseja vapautuu myös solun sisältä sen hajotessa. Proteaasien toimintaa estetään lisäämällä uuttopuskuriin proteaasi-inhibiittoreita, kuten fenyyylimetyylisulfonylfluoridia (PMSF) ja leupeptiinia, jotka hidastavat proteaasien toimintaa suojaten näin proteiineja. (Pingoud ym. 2002, 49 – 51.)

Proteiinien pitoisuuden määrittämiseen on useita eri menetelmiä. Käytettävä menetelmä valitaan tutkittavan proteiinin ja muiden proteiininäytteessä olevien komponenttien luonteen sekä halutun nopeuden, tarkkuuden ja herkkyyden perusteella. Proteiinipitoisuuden määritysmenetelmiä ovat esimerkiksi biureettitesti, Lowry (Folin-Ciocalteu) määrittäminen, bisinkoniinihappo (bicinchoninic acid, BCA) määrittäminen ja Bradford-määrittäminen. (Switzer & Garrity 1999, 93.) Bradford-menetelmä perustuu Coomassie Brilliant Blue –väriaineen sitoutumiseen proteiiniin, jonka seurauksena väriaineen absorbanssimaksimi siirtyy 465 nm:stä 595 nm:iin. Absorbanssin muutos 595 nm:ssä määritetään spektrofotometrisesti. Menetelmä on herkkä, toistettava ja nopea. Määrittäksen värireaktio tapahtuu noin kahdessa minuutissa ja pysyy muuttumattomana tunnin ajan. (Bradford 1976, 248 – 254.) Väriaine sitoutuu herkimmin proteiinien arginiini- ja lysiinijäämiin, joka aiheuttaa vaihtelua määrittä tuloksiin analysoidessa erilaisia proteiineja. Standardisuoran määrittäykseen kannattaa tästä syystä käyttää samankaltaista proteiinia kuin määrittä proteiini. Usein tämä ei kuitenkaan ole käytännössä mahdollista, jolloin proteiinimäärittä on suhteellista. Yleisesti käytettyjä proteiinistandardeja ovat esimerkiksi naudan seerumin albumiini (BSA, bovine serum albumin) sekä naudan plasman gammaglobuliini. (Kruger 2002, 15 – 20.)

#### 2.4.3 Rekombinanttiproteiinin karakterisointi

Western blot –menetelmässä eri proteiinit erotetaan proteiiniseoksesta niiden molekyylipainon mukaan natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelillä (SDS-PAGE), jonka jälkeen proteiinit siirretään membraanille elektroforeettisesti (Sheehan 2009, 190 – 192). Proteiinit tunnistetaan membraanilta käyttäen proteiineille spesifisiä vasta-aineita (Dickinson & Fowler 2002, 429).

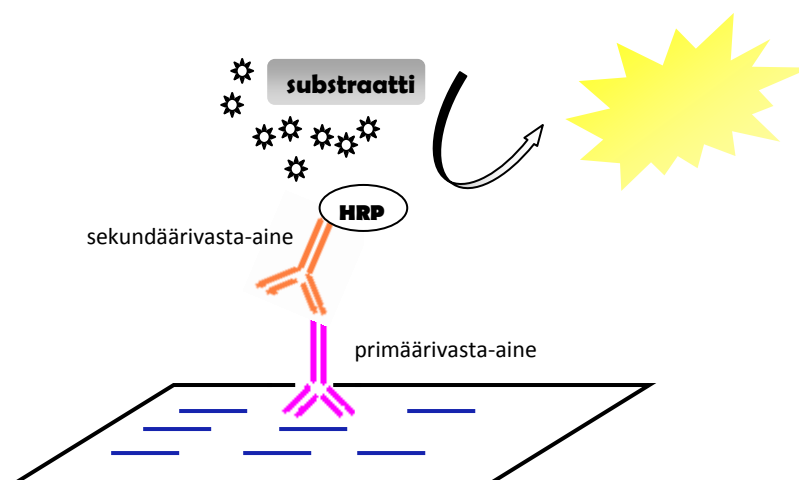
Ennen SDS-PAGE-ajoa proteiininäytteitä keitetään  $\beta$ -merkaptoetanolilla ja natriumdodekyylisulfaattia (SDS) sisältävän näytenäytteen kanssa.  $\beta$ -merkaptoetanolilla pelkistää proteiinin kvaternääristä rakennetta ylläpitävät rikkisillat ja SDS denaturoi proteiinin sitoutumalla siihen voimakkaasti. Käsittelyllä proteiinin rakenne denaturoidaan lineaariseksi ja proteiinille muodostuu negatiivinen varaus SDS:n vaikutuksesta. Näytenäyte sisältää myös väriainetta, kuten bromofenolisinistä, jonka avulla näytenäytteen kulkua voidaan seurata ajon aikana sekä glyserolia, jolla kasvatetaan näytenäytteen tiheyttä. Näytenäytteen ollessa ajonäytteenä raskaampaa, näyte laskeutuu näytenäytteenä eikä sekoitu ajonäytteenä. (Walker 2002, 63.)

SDS-PAGE:ssa käytetään kaksiosaista geeliä, jossa ennen erottelevaa geeliä on lyhyempi ja huokoskooltaan suuri näytteenäytteenä konsentroiva geeli. Konsentroiva geeli kokoaa proteiininäytteen teräväksi näytenäytteenä ennen näytteen siirtymistä erottelevaan geeliin mahdollistaen näin hyvän resoluution suurillakin näytemäärillä. Kun geeli asetetaan sähkövirtaan, negatiivisesti varautuneet proteiinit kulkeutuvat kohti positiivista elektrodia erottuen fraktioiksi molekyylipainonsa mukaisessa järjestyksessä. Pienet molekyylit kulkeutuvat geelillä isompia molekyylejä nopeammin. (Walker 2002, 62 – 63.) SDS-PAGE:lla erotetut proteiinit siirretään elektroforeettisesti geeliltä nitroselluloosa-, polyvinylidifluoridi- (PVDF) tai nylonmembraanille (Switzer & Garrity 1999, 291). Elektroforeettisessa blottauksessa proteiinit siirretään geeliltä membraanille sähkövirran avulla joko vaakatasossa puolikuivalla (semidry) blottausmenetelmällä tai pystysuorassa asettamalla geeli ja membraani tiukasti toisiaan vasten pakattuna siirtopuskurilla täytettyyn kammioon. Puolikuivassa blottausmenetelmässä geeli ja membraani asetetaan toisiaan vasten siirtopuskuriin kastettujen suodatinpaperien väliin ja muodostunut blottausleipä asetetaan kahden elektrodilevyn väliin. (Gravel 2002, 321.)

Kun proteiinit on siirretty geeliltä membraanille, siitä sidotaan kaikki epäspesifiset vasta-aineen sitoutumiskohdat käsittelemällä membraania epäspesifistä proteiinia sisältävällä blokkauksella (Sheehan 2009, 191). Blokkauksella voidaan tehdä esimerkiksi maitojauheesta, naudan seerumin albumiinista (BSA, bovine serum albumin) tai kaseiinista valmistetulla liuoksella. Blokkauksella on tärkeä vaihe, sillä vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen membraaniin vaikeuttaa tutkittavan proteiinin havainnointia. (Switzer & Garrity 1999, 291.) Blokkauksen jälkeen membraanille lisätään tutkittavalle proteiinille spesifistä vasta-ainetta (primääri-vasta-aine), joka

tunnistaa tutkittavan proteiinin ja sitoutuu siihen (kuvio 3) (Clark & Pazdernik 2009, 273). Primäärivasta-ainekäsittelyn jälkeen membraani pestään sitoutumattoman ja epäspesifisesti sitoutuneen primäärivasta-aineen poistamiseksi. Pesupuskuri sisältää ionitonta detergenttiä, joka häiritsee vasta-ainekäsittelyn aikana syntyneitä primääriseen vasta-aineen ja epäspesifisten proteiinien välisiä hydrofobisia vuorovaikutuksia. (Switzer & Garrity 1999, 292.)

Membraania käsitellään primäärivasta-aineeseen sitoutuvalla sekundäärisellä vasta-aineella (Clark & Pazdernik 2009, 273), joka on usein leimattu helposti havaittavalla radioaktiivisella, fluoresoivalla tai entsyymaattisella leimalla (Dickinson & Fowler 2002, 429). Sekundääriseen vasta-aineeseen sidottu entsyymi voi olla esimerkiksi piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) tai alkaalinen fosfataasi. Epäspesifisesti sitoutuneen ja sitoutumattoman sekundääriseen vasta-aineen pois pesun jälkeen sekundääriseen vasta-aineeseen sidottu entsyymi, kuten HRP, voidaan havaita membraanilta substraatin avulla. Substraatti sisältää vetyperoksidia ( $H_2O_2$ ), joka muuttaa HRP:n hapetettuun muotoon sekä luminolia, jonka HRP muuttaa pelkistetyistä muodosta hapetettuun muotoon. Tämän entsyymi-substraattireaktion seurauksena syntyy aallonpituudella 428 nm absorboivaa valoa, jonka perusteella voidaan havaita tutkittavan proteiinin sijainti ja suhteellinen määrä membraanilla (kuvio 3). (Switzer & Garrity 1999, 292 - 293.)



KUVIO 3. Membraaniin sitoutuneiden proteiinien tunnistaminen Western blot –menetelmällä.

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

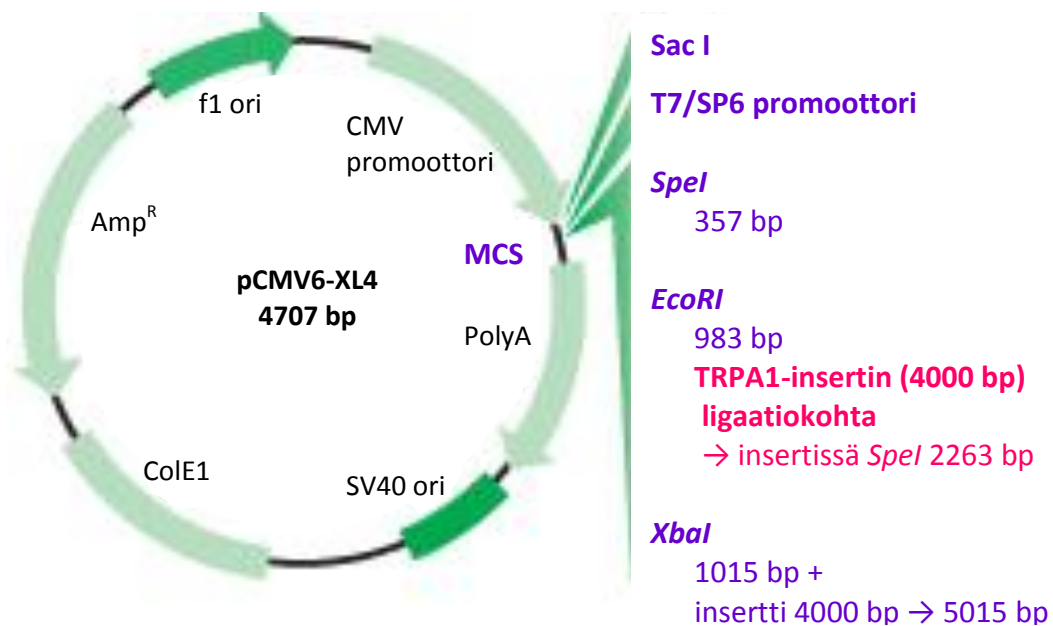
Kehittämistehtävä toteutettiin osana laajempaa TRPA1-tutkimusta, jossa selvitetään TRPA1:n merkitystä tulehduksessa ja tulehduskivussa. Kehittämistehtävän tavoitteena oli tuottaa TRPA1-tutkimuksessa tarvittavia TRPA1-proteiinia voimakkaasti ilmentäviä soluja, joita voidaan käyttää positiivisena kontrollinäytteenä Western blot ja RT-qPCR-määrityksissä sekä TRPA1:n funktion tutkimisessa. Tarkoituksena oli transfektoida TRPA1-geenin sisältävä plasmidi soluihin, tuottaa plasmidin sisältävissä soluissa TRPA1-proteiinia ja karakterisoida tuotettu TRPA1-proteiini Western blot –menetelmällä.

Kehittämistehtävän tavoitteena oli:

1. Monistaa TRPA1 plasmidi-DNA:ta kompetentteissa *E. coli* –bakteerisoluihin ja tehdä eristetylle ja puhdistetulle plasmidi-DNA:lle restriktioanalyysi
2. Tuottaa TRPA1-proteiinia transientisti transfektoiduissa HEK-293-soluissa
3. Karakterisoida tuotettu TRPA1-proteiini Western blot -menetelmällä

#### 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kehittämistehtävässä käytetty TRPA1-rekombinanttiplasmidi on kaupallinen plasmidi, jossa TRPA1:n nukleotidisekvenssin sisältävä insertti on ligatoitu pCMV6-XL4-vektoriin (Origene) (kuvio 4). pCMV6-XL4-vektori on kooltaan 4707 bp ja TRPA1-insertti 4000 bp eli plasmidi-DNA:n koko yhteensä on 8707 bp. Kehittämistehtävässä käytettiin kaupallisesta TRPA1-rekombinanttiplasmidista monistettua plasmidi-DNA:ta. Plasmidivektorissa on sytomegalovirus (CMV)-promoottori *in vivo* -ekspressiota varten ja ampicilliiniresistenssigeeni seulontaa varten. Vektorissa on tunnistuskohdat muun muassa *SpeI* ja *XbaI* restriktioentsyymeille, jotka valittiin restriktioanalyysiin. TRPA1:n sekvenssissä on myös tunnistuskohta *SpeI*-restriktioentsyymille, joten entsyymi digestoi rekombinanttiplasmidin kahdesta eri kohdasta.



**KUVIO 4.** Rekombinanttiplasmidi-DNA:n vektorikartta. Rekombinantti-DNA (8707 bp) koostuu pCMV-XL4-vektorista (4707 bp), johon on ligatoitu 4 000 bp kokoinen TRPA1-insertti *EcoRI*-restriktiokohtaan. Vektorissa on CMV-promoottori, ampicilliiniresistenssigeeni ja tunnistuskohdat MCS-alueella muun muassa *SpeI* ja *XbaI* restriktioentsyymeille. *SpeI* restriktioentsyymillä on tunnistuskohta myös TRPA1-insertissä. (Origene kuvaa mukaillen Kukkonen 2010.)



## 4.1 TRPA1 plasmidin tuotto

### 4.1.1 Transformaatio *E. coli* –soluihin

TRPA1-plasmidia transformoitiin kompetentteihin *E. coli* -soluihin (Invitrogen) valmistajan ohjeen mukaan. Kompetentit bakteerisolut sulatettiin jäällä, jonka jälkeen soluputkeen lisättiin TRPA1-plasmidia ja putkea inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Transformaatioreaktiota varten putkea inkuboitiin +42 °C asteessa 30 sekuntia ja putkeen lisättiin huoneenlämpöistä S.O.C. mediumia (Invitrogen). Transformoituja soluja inkuboitiin +37 °C asteessa sekoittajassa tunnin ajan. Esikasvatettua bakteerisuspensiota maljattiin lämmitetyille ampicilliini-selektiivisille LB-agarmaljoille ja maljoja inkuboitiin yön yli +37 °C asteessa. Kasvatuksen jälkeen maljoilta valittiin irralliset pesäkkeet liuoskasvatukseen.

Esikasvatusta varten siirrostettiin yksi irrallinen bakteeripesäke ampicilliini-selektiiviseen LB-Broth-mediumiin ja esikasvatusliuoksia inkuboitiin +37 °C asteessa sekoituksessa 8 tuntia. Esikasvatettua bakteerisuspensiota laimennettiin jatkokasvatusta varten ampicilliini-selektiiviseen LB-Broth-mediumiin. Jatkokasvatusliuoksia inkuboitiin +37 °C asteessa sekoituksessa 16 tuntia. TRPA1-plasmidin sisältämistä bakteerisoluista valmistettiin myös 15 % glyserolia sisältävä glyserolipreparaatti myöhempää käyttöä varten.

### 4.1.2 Plasmidi-DNA:n eristys, puhdistus ja pitoisuuden määrittäminen

Jatkokasvatetuista bakteerisuspensioista eristettiin ja puhdistettiin plasmidi-DNA alkaaliseen hajoitukseen perustuvalla PureYield™ Plasmid Midiprep System –kitillä (Promega) valmistajan ohjeen mukaan käyttäen sentrifugointi-menetelmää. Plasmidi-DNA:n pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti käyttäen Eppendorf Biophotometer 6131 -spektrofotometriä. Plasmidi-DNA:sta valmistettiin laimennokset nukleaasivapaaseen veteen ja näytteen absorbanssit mitattiin aallonpituuksilla 260 nm, 280 nm ja 320 nm. Nollanäytteenä käytettiin nukleaasivapaata vettä.

#### 4.1.3 Plasmidi-DNA:n restriktioanalyysi

Eristetylle ja puhdistetulle plasmidi-DNA:lle tehtiin restriktioanalyysi digestoimalla tuotettu plasmidi-DNA *SpeI* (Promega) ja *XbaI* (Fermentas) restriktioentsyymeillä ja ajamalla digestiotuotteet agarosigeelille. Restriktiopuskurina käytettiin 10x Multi-CORE™ Buffer –puskuria (Promega) ja reaktioon lisättiin myös asetyloitua naudan seerumin albumiinia (BSA, Promega) sekä steriiliä deionisoitua vettä. Plasmidi-DNA:n sisältävä reaktioseos sekoitettiin pipetoimalla rauhallisesti ja lisättiin restriktioentsyymi. Reaktioseoksia inkuboitettiin tunnin ajan +37 °C:ssa. Digestiotuotteisiin lisättiin 6x Mass Loading Dye Solution –näytepuskuria (Fermentas).

Restriktioanalyysiä varten valmistettiin 1 % agarosigeeli, jossa oli 0,5 µg/ml etidiumbromidia. Ajopuskurina käytettiin 1x TAE-puskuria (tris-asetatti 40 mM, EDTA 1 mM). Restriktioanalyysiä varten geelille pipetoitiin 15 µl kutakin digestiotuotetta / kaivo. Molekyylipainomarkkeriksi pipetoitiin 10 µl GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Näytteitä ajettiin geelillä 60 V jännitteellä kunnes näyterintama oli noin 1 cm:n päässä geelin alareunasta. Geeli kuvattiin UV-valossa (FluorChem 8800, Alpha Innotech Corporation).

#### 4.2 TRPA1-proteiinin tuotto

TRPA1-proteiinia haluttiin tuottaa helposti transfektoitavissa olevilla soluilla, joten solulinjaksi valittiin adherentit ihmisen alkion munuaisepiteelisolut, jotka on muunnettu stabiiliksi linjaksi adenoviruksella (HEK-293). HEK-293-soluja (ATCC) kasvatettiin Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)–kasvatusliuoksessa (Lonza), jossa oli 10 % naudan sikiön seerumia (Lonza), antibiootti/antimykoottia (penisilliini, streptomysiini ja amfoterisiini B, Invitrogen), natriumbikarbonaattia (Lonza), natriumpyruvaattia (Lonza) ja NEAA (non essential aminoacids, Lonza). Soluja kasvatettiin 5 %:ssa CO<sub>2</sub>-atmosfäärissä + 37 °C asteessa.

#### 4.2.1 Transfektointi HEK-293-soluihin

HEK-293 solut jaettiin antibiootittomaan kasvatusliuokseen 24- ja 6-kuoppalevyille 24 tuntia ennen transfektiota tiheydellä, jolla saavutettiin noin 90 % konfluenssi transfektiohetkellä. Transfektioareagenssina käytettiin Lipofectamine 2000 –areagenssia (Invitrogen) ja transfektio tehtiin valmistajan ohjeen mukaan transfektoimalla 24-kuoppalevyille 0,8 µg plasmidi-DNA:ta ja 6-kuoppalevyille 4 µg plasmidi-DNA:ta. Transfektioareagenssi ja plasmidi-DNA laimennettiin antibiootittomalla ja seerumittomalla mediumilla omiin putkiinsa suunniteltuihin pitoisuuksiin, sekoitettiin naputtelemalla putkea ja inkuboituihin 5 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen laimennokset yhdistettiin samaan putkeen siirtämällä DNA-laimennos transfektioareagenssiputkeen, sekoitettiin naputtelemalla putkea ja inkuboituihin 20 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen transfektioseosta lisättiin transfektoitaville soluille 100 µl 24-kuoppalevyille ja 500 µl 6-kuoppalevyille. Transfektoimattomille kontrollisoluille lisättiin vastaavasti antibiootitonta ja seerumitonta kasvatusliuosta. Transfektointiaika oli 24 tunnista 48 tuntiin. Soluilla, joilla kokonaiskasvatusaika oli 48 tuntia ja transfektointiaika 24 tuntia, transfektioseoksen sisältävä kasvatusliuos poistettiin soluilta transfektoinnin jälkeen ja tilalle laitettiin antibiootitonta kasvatusliuosta 24 tunnin ajaksi.

#### 4.2.2 Transfektiotehokkuuden arviointi

Transfektiotehokkuutta arvioitiin transfektoimalla soluihin TRPA1-plasmidi-DNA:n kanssa siGLO Green -transfektioindikaattoria (Dharmacon, Thermo Scientific), joka fluoresoi vihreänä. siGLO Green –transfektioindikaattorin käyttöpitoisuus valittiin valmistajan ohjeen mukaan ja se laimennettiin sopivaan pitoisuuteen käyttäen 1x siRNA Buffer –puskuria, joka oli laimennettu 5x siRNA Buffer –puskurista (Dharmacon) käyttäen DEPC-käsiteltyä vettä. Transfektoituja soluja kasvatettiin 24 tuntia +37 °C:n lämpötilassa 5 %:ssa CO<sub>2</sub>-atmosfäärissä, jonka jälkeen niitä tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla (Nikon Eclipse Ti, GWB). Transfektiotehokkuutta arvioitiin visuaalisesti vertaamalla vihreänä fluoresoivien solujen määrää solujen kokonaismäärään. Transfektiotehokkuuden arvioimisen kontrollina käytettiin soluja, joita ei käsitelty transfektiooliuksella.

#### 4.2.3 Proteiinien eristys ja proteiinipitoisuuden määrittäminen

Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt siirrettiin jälle, kasvatusliuos imettiin pois ja soluja pestiin kaksi kertaa PBS:llä (natriumkloridi 137 mM, kaliumkloridi 2,7 mM, dinatriumvetyfosfaattidihydraatti 8,1 mM, kaliumdivetyfosfaatti 1,5 mM, pH 7,4). Soluille lisättiin 24-kuoppalevyille 100 µl ja 6-kuoppalevyille 250 µl kylmää eristysliuosta (tris 65,2 mM, natriumkloridi 154 mM, NP-40 1 %, natriumdeoksykolaatti 0,25 %, EDTA 1 mM, fenyyliimetyylisulfonyylifluoridi 1 mM, natriumortovanadaatti 1 mM, leupeptiini 40 µg/ml, aprotiniini 1 µg/ml, natriumfluoridi 1 mM, natriumpyrofosfaatti 2 mM), inkuboitiin 15 min ja solut irrotettiin kuoppien pohjista raaputtamalla. Solulysaatti siirrettiin jäällä mikrosentrifuugiputkiin, joita sentrifugoitiin 10 min +4 °C 12 000 rpm (IEC Micromax RF Refrigerated Microcentrifuge, Thermo Electron Corporation). Proteiinit sisältävästä supernatantista valmistettiin näyte SDS-PAGE ja Western blot –analysointia varten yhdistämällä kolme osaa supernatanttia ja yksi osa näytekupskuria (tris pH 6,8 62,5 mM, glyseroli 10 %, SDS 2 %, bromofenolisininen 0,025 %, β-merkaptotetanoli 5 %).

Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä Coomassie Protein Assay Reagent Kit –kitillä (Pierce). Proteiininäytteestä tehtiin laimennos deionisoituun veteen. Albumiini-kantastandardista (2,0 mg/ml) valmistettiin standardisuoran määrittämiseksi pitoisuudet 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml ja 0,03125 mg/ml. Nollanäytteenä käytettiin deionisoitua vettä. Tasapohjaiselle 96-kuoppalevyille pipetoitiin käänteisesti nollanäyte, standardinäytteet pienimmästä suurimpaan pitoisuuteen ja näytteet kahtena rinnakkaisena. Kuoppiin lisättiin huoneenlämpöistä värireagenssia, jonka jälkeen levyä inkuboitiin noin 10 min huoneenlämmössä. Proteiinipitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac) aallonpituudella 590 nm.

#### 4.3 Karakterisointi Western blot -menetelmällä

Proteiininäytteistä tutkittiin TRPA1-proteiinin ilmentymistä Western blot –menetelmällä. Näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-PAGE:lla käyttäen 4 %:sta konsentrintigeeliä (akryyliamidi/bis 4 %, tris pH 6,8 125 mM, SDS 0,1 %, ammoniumpersulfaatti 0,08 %, TEMED 0,2 %) ja 8 %:sta erottelugeeliä

(akryyliamidi/bis 8 %, tris pH 8,8 375 mM, SDS 0,1 %, ammoniumpersulfaatti 0,08 %, TEMED 0,08 %). Näytekaivoihin pipetoitiin 35 µg proteiinia. Ennen näytteiden pipetointia näytteitä kuumennettiin 95 °C:ssa noin 5 minuuttia ja ne siirrettiin jälle. Koon arvioimiseksi käytettiin PageRuler- molekyylipainomarkkeria (Fermentas). Geelille pipetoituja näytteitä ajettiin ajopuskurissa (tris 25 mM, glysiini 250 mM, SDS 3mM) 80 V jännitteellä kunnes näyterintama oli konsentroitigeelin alareunassa, jonka jälkeen ajoa jatkettiin 120 V jännitteellä kunnes 43 kDa:n markkeri oli geelin alareunassa.

Proteiinien siirto geeliltä nitroselluloosamembraanille (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) tehtiin puolikuivalla blottausmenetelmällä. Geeli leikattiin sopivan kokoiseksi määritettävän proteiinin molekyyli­massan mukaisesti käyttäen apuna proteiinipainomarkkeria. Geeli sekä samankokoinen membraani ja kolme suodatinpaperia kastettiin katodipuskuriin (tris 25 mM, glysiini 0,3 %, metanoli 20 % pH 9,5), kaksi suodatinpaperia anodi 2 –puskuriin (tris 25 mM, metanoli 10 % pH 10,4) ja yksi anodi 1 –puskuriin (tris 300 mM, metanoli 10 % pH 10,4). Siirtopuskureihin kastetuista suodatinpapereista, geelistä ja membraanista rakennettiin blottausleipä, joka asetettiin blottauslaitteistoon (Separation Systems, Owl). Proteiinien siirtoon käytettävä virta laskettiin blottausleivän pinta-alan mukaan  $2,0 \text{ mA/cm}^2$  ja blottausaika oli 60 minuuttia.

#### 4.3.1 TRPA1:n ekspression määrittäminen

Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi membraania inkuboitin rasvatonta maitojauhetta (5 %) sisältävässä TBS/T-liuoksessa (tris 20 mM, natriumkloridi 150 mM, pH 7,6, tween 20 0,1 %) tunnin ajan huoneenlämmössä sekoittajassa. Primäärivasta-aineesta (Anti-TRPA1 extra cellular rabbit polyclonal, Alomone labs) valmistettiin 1:200 laimennos rasvatonta maitojauhetta (5 %) sisältävään TBS/T-liuokseen. Membraania inkuboitin primäärivasta-aineliuoksessa +4 °C:ssa yön yli sekoituksessa. Sitoutumattoman ja epäspesifisesti sitoutuneen vasta-aineen poistamiseksi membraania pestiin neljä kertaa viiden minuutin ajan TBS/T-liuoksella huoneenlämmössä sekoituksessa. Sekundäärisestä vasta-aineesta (goat anti-rabbit IgG-HRP, Pierce) valmistettiin 1:5000 laimennos rasvatonta maitojauhetta sisältävään TBS/T-liuokseen ja membraania inkuboitin vasta-aineliuoksessa 60 minuuttia

huoneenlämmössä sekoituksessa. Membraani pestiin neljä kertaa viiden minuutin ajan TBS/T-liuoksella ja TRPA1 määritettiin membraanilta detektioagenssilla (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce). Membraani kuvattiin ImageQuant LAS 4000 mini –kuvantamislaitteella (GE Healthcare).

#### 4.3.2 Aktiinin ekspresion määrittäminen

Proteiinimäärän kontrollina määrittämisessä käytettiin aktiinia, joka määritettiin samoin kuin TRPA1 ekspresio. Spesifisestä aktiini vasta-aineesta (Actin rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz) valmistettiin 1:1000 laimennos rasvatonta maitojauhetta (5 %) sisältävään TBS/T-liuokseen. Blokkauksen jälkeen membraania inkuboitiin primäärivasta-aineliuoksessa +4 °C:ssa yön yli sekoituksessa. Membraanin pesun jälkeen sekundäärisestä vasta-aineesta (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz) valmistettiin 1:2000 laimennos rasvatonta maitojauhetta sisältävään TBS/T-liuokseen ja membraania inkuboitiin vasta-aineliuoksessa 45 minuuttia huoneenlämmössä sekoituksessa. Pesujen jälkeen aktiinin ekspresio määritettiin membraanilta detektioagenssilla (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce).

## 5 TULOKSET

### 5. 1 Plasmidi-DNA:n analysointi ja restriktiokartoitus

Monistetun ja eristetyn TRPA1-plasmidi-DNA:n pitoisuus ja puhtaus määritettiin spektrofotometrisesti kahdella eri laimennoksella kahdesta eri plasmidi-DNA:sta. Puhtaalla DNA:lla aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm määritettyjen absorbanssien suhde on 1,8. Eristettyjen plasmidi-DNA näytteiden puhtaus oli noin 1,73 ja plasmidi-DNA:n pitoisuus molemmilla määrittäyslaimennoksilla on lähes sama, joten tuloksista voidaan laskea pitoisuuksien keskiarvoiksi 214, 25 µg/ml ja 197,0 µg/ml (taulukko 1).

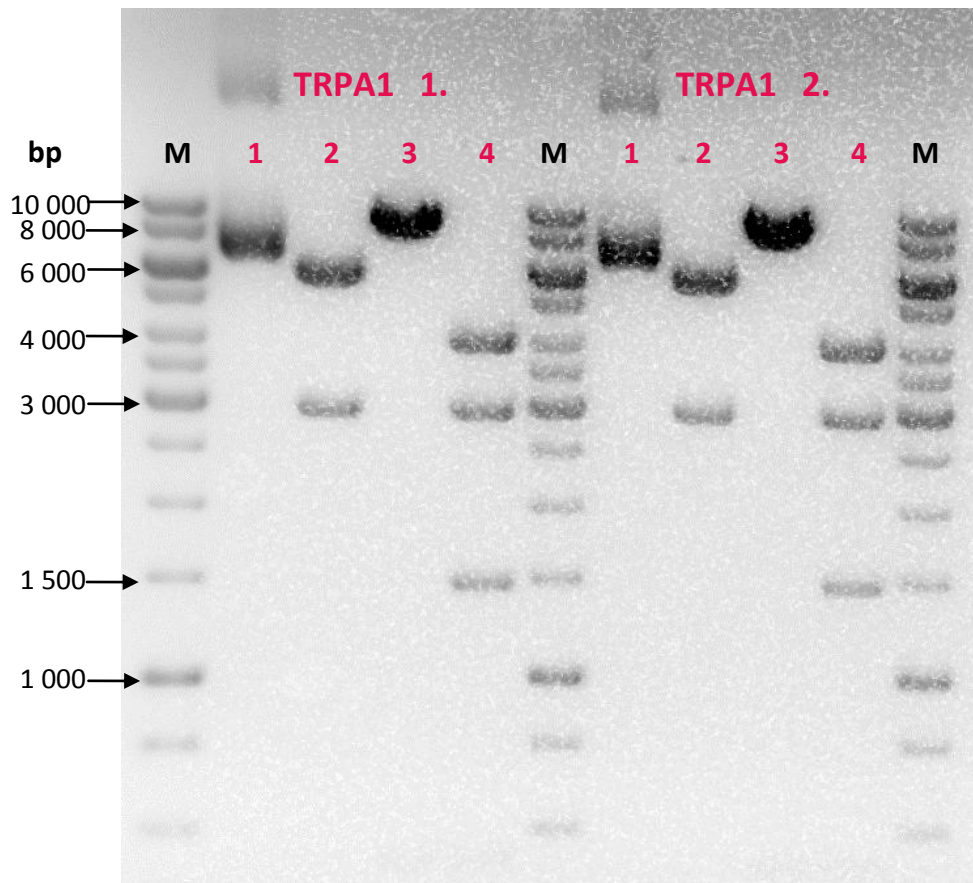
TAULUKKO 1. Eristettyjen TRPA-1 plasmidi-DNA-näytteiden pitoisuus ja puhtaus.

Näyte	Laimennos	Pitoisuus [µg/ml]	Pitoisuus [ug/ml] keskiarvo	Puhtaus [A260/A280]
TRPA1 1.	1:10	208,6	<b>214,25</b>	1,73
TRPA1 1.	1:20	219,9		1,72
TRPA1 2.	1:10	196,3	<b>197,00</b>	1,73
TRPA1 2	1:20	197,7		1,72

Monistetulle TRPA1-plasmidi-DNA:lle tehtiin restriktioanalyysi digestoimalla DNA *SpeI* ja *XbaI* restriktioentsyymeillä ja analysoimalla digestiotuotteet AGE-geelillä (kuvio 5, s. 24). Plasmidi-DNA:n koko on valmistajan mukaan 8707 bp. Koon tarkistamiseksi plasmidi-DNA linearisoitiin *XbaI* restriktioentsyymillä ja kuviosta 5 (s. 24) nähdään linearisoidun plasmidi-DNA:n koon olevan 8 000 – 10 000 bp välillä eli koko on odotettu. Digestoimaton plasmidi-DNA on ajautunut geelillä pidemmälle, sillä sirkulaarinen eli digestoimaton ja lineaarinen DNA kulkeutuvat geelillä eri nopeudella (kuvio 5, s. 24).

*SpeI* restriktioentsyymillä on plasmidi-DNA:ssa kaksi tunnistuskohtaa, toinen vektorissa ja toinen TRPA1-insertissä (kuvio 4, s. 16). Tunnistuskohtien perusteella plasmidi-DNA:n pitäisi digestoitua kahteen osaan, jotka ovat kooltaan 2889 bp ja 5818 bp. Kuviosta 5 (s. 24) nähdään plasmidi-DNA:n digestoituneen kahteen osaan kooltaan

noin 6 000 bp ja hieman alle 3 000 bp, joten fragmentit ovat odotetun kokoisia. Plasmidi-DNA:lle tehtiin myös kaksoisdigestio *SpeI* ja *XbaI* restriktioentsyymeillä, jolloin plasmidi-DNA:n pitäisi digestoitua kolmeen osaan kooltaan 1769 bp, 2889 bp ja 4049 bp. Restriktioanalyysissä geelillä nähdään digestiotuotteet noin kohdilla 4 000 bp, hieman alle 3 000 bp ja hieman alle 1 500 bp (kuvio 5). Plasmidi-DNA on siis digestoinut odotetusti kolmeen osaan ja fragmenttien koot ovat lähellä odotettua.



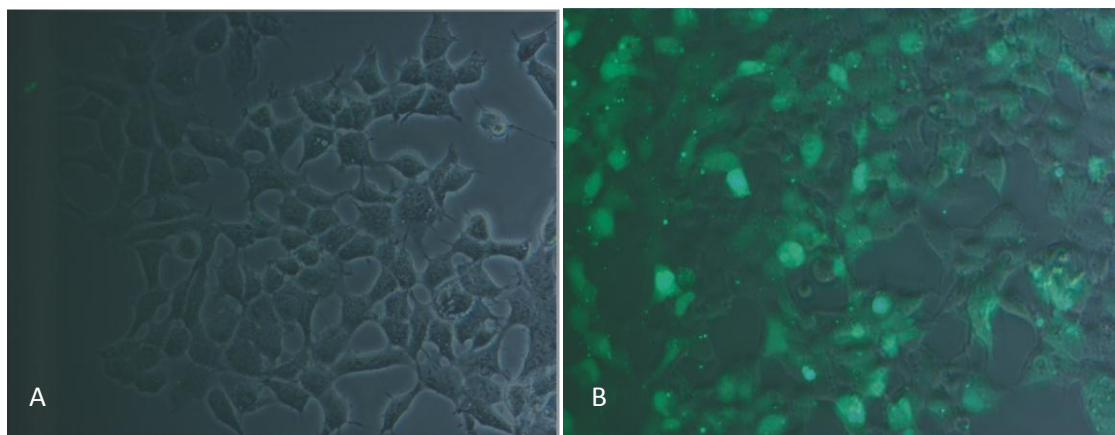
KUVIO 5. TRPA1 plasmidi-DNA:n restriktioanalyysi AGE:lla. M = Molekyylipainomarkkeri, 1 = digestoimaton plasmidi, 2 = *SpeI* digestio, 3 = *XbaI* digestio, 4 = *SpeI* ja *XbaI* kaksoisdigestio.

## 5.2 Transfektio tehokkuuden arviointi fluoresoivalla indikaattorilla

Lipofektion transfektio tehokkuutta määritettiin transfektoimalla HEK-293 soluihin TRPA1-plasmidi-DNA:n kanssa fluoresoiva indikaattoriaine (siGLO, Dharmafect). Kontrollisoluina transfektio tehokkuuden määrittämisessä käytettiin soluja, joille ei laitettu transfektio reagenssia. 24 tunnin transfektion jälkeen soluja tarkasteltiin



fluoresenssimikroskoopilla (kuvio 6). Kuviossa 6A on kuvattu kontrollisolut, joissa ei näy fluoresenssia eli soluihin ei ole transfektoitunut fluoresoivaa indikaattoriainetta. Kun soluja käsiteltiin transfektioliuksella, fluoresoiva indikaattoriaine on transfektoitunut solujen sisään ja indikaattoriaineen sisältävät solut fluoresoivat vihreänä (kuvio 6B). Fluoresenssin määrän perusteella transfektiotehokkuus HEK-293-soluissa lipofektiolla on noin 90 %.

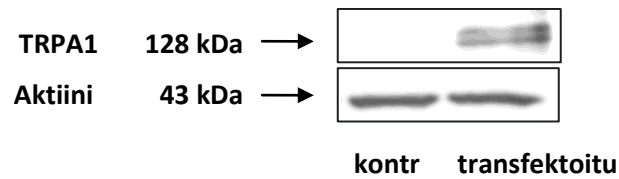


KUVIO 6. Transfektioefektin arvioinnin fluoresenssikuva. Solut kuvattiin ensin normaalisti ja sen jälkeen fluoresenssinäkymällä, jonka jälkeen kuvat on asetettu päällekkäin. A) Kontrollisolut, joihin lisätty TRPA1-plasmidi-DNA ja siGLO, mutta ei transfektioainetta. B) Transfektoidut solut, joihin transfektoitu TRPA1-plasmidi-DNA ja siGLO.

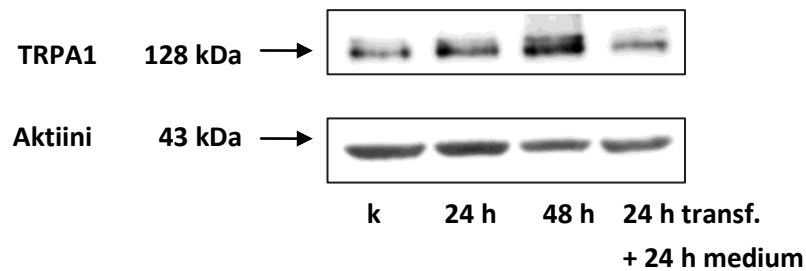
### 5.3 TRPA1-rekombinanttiproteiinin karakterisointi Western blot -menetelmällä

HEK-293-soluissa tuotettua TRPA1-rekombinanttiproteiinia määritettiin Western blot -menetelmällä. HEK-293-soluja transfektoitiin TRPA1-plasmidi-DNA:lla 24 ja 48 tuntia. Lisäksi tehtiin transfektio, jossa soluja transfektoitiin ensin 24 tuntia, jonka jälkeen transfektioliuos poistettiin ja soluja inkuboitiin 24 tuntia antibiootittomassa kasvatusliuoksessa. Western blot -määrittelyä varten proteiininäytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin ja kutakin proteiininäytettä ladattiin geelille yhtä suuri pitoisuus (35 µg). Proteiinimäärän kontrolloimiseksi näytteistä määritettiin myös kontrolliproteiininä aktiini (43 kDa), jonka määrä näytteissä on tasainen (kuvio 7 ja kuvio 8, s. 26).

Tuotettu TRPA1-proteiini karakterisoitiin Western blot –määrityksellä ja sen koko oli 128 kDa (kuvio 7). Kuviosta 8 nähdään TRPA1-proteiinin määrän lisääntyvän transfektioajan pidentyessä 48 tuntiin. TRPA1-proteiinin ilmentyminen vaikuttaisi kuitenkin hidastuvan tai pysähtyvän, kun soluilta otetaan pois TRPA1-plasmidi-DNA:ta ja transfektioliuosta sisältävä kasvatusliuos ja tilalle vaihdetaan pelkkä kasvatusliuos 24 tunnin transfektion jälkeen (kuvio 8).



KUVIO 7. TRPA1-proteiinin karakterisointi Western blot –menetelmällä. Vasemmalla on transfektoimaton kontrollinäyte ja oikealla TRPA1-plasmidi-DNA:lla transfektoitu HEK-293-solunäyte.



KUVIO 8. Transfektioajan vaikutus TRPA1-proteiinin ilmentymiseen. k = Transfektoimaton kontrollinäyte.

## 6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELUA

Kehittämistehtävän tavoitteena oli tuottaa TRPA1-proteiinia, joka voitiin määrittää Western blot –menetelmällä. TRPA1 proteiinin tuotto TRPA1-plasmidi-DNA:lla transfektoiduissa HEK-293-soluissa ja karakterisointi Western blot -menetelmällä onnistui.

TRPA1-plasmidi-DNA:n transformointi ja monistus *E. coli* –bakteerisoluissa onnistui. Työssä käytetyt kompetentit *E. coli* -solut kasvoivat esikasvatusvaiheessa kuitenkin odotettua heikommin. Esikasvatusmaljoilla kasvoi vain vähän pesäkkeitä ja kasvaneet pesäkkeet olivat pieniä. Syynä saattoi olla solujen huono kunto tai mahdollisesti huono transformaatiotehokkuus. TRPA1-plasmidi-DNA:n transformatio *E. coli* -soluihin kuitenkin onnistui, sillä ampisilliiniselektion vuoksi esikasvatusmaljoilla pystyivät kasvamaan vain TRPA1-plasmidin sisältävät bakteerisolut. Transformaatiotehokkuutta olisi voinut arvioida laittamalla transformoituja soluja kasvamaan maljoille, joissa ei olisi ollut selektiotekijää. Tässä työssä transformaatiotehokkuuden arviointi ei kuitenkaan ollut tarpeellista, sillä pienikin transformaatiotehokkuus on riittävä kun jatkokasvatukseen otetaan vain muutama pesäke. Jatkokasvatuksessa solut kasvoivat hyvin ja niistä saatiin eristettyä tarvittava määrä plasmidi-DNA:ta.

Eristettyjen plasmidi-DNA näytteiden puhtaus oli hyvä (1,73), joten eristetty plasmidi-DNA ei tarvinnut jatkopuhdistuskäsittelyä vaan oli sellaisenaan käyttökelpoista transfektioihin. Restriktiokartoituksella varmistettiin plasmidi-DNA:n olevan oikean kokoista ja että, plasmidi-DNA ei ollut hajonnut eristyksen aikana. TRPA1-proteiinin tuottoa varten valittiin helposti transfektoituvat humaanin alkion munuaisepiteelisolut, HEK-293, ja transfektiomenetelmäksi HEK-293-soluissa hyvin toimiva lipofektio. Transfektioitehokkuutta arvioitiin käyttämällä vihreänä fluoresoivaa SiGLO Green -transfektioindikaattoria, joka transfektoitiin soluihin plasmidi-DNA:n kanssa. Lipofectamine 2000 –transfektioareagenssin (Invitrogen) transfektioitehokkuuden HEK-293-soluissa todettiin visuaalisesti tarkasteltuna olevan hyvä (noin 90 %). Transfektioolosuhteita optimoitiin säätelämällä solutiheyttä ja aikaa kunnes löydettiin TRPA1-proteiinin tuotolle sopivat olosuhteet. Transfektioareagenssin haluttiin olevan soluille mahdollisimman haitaton ja soluista eristettyjen proteiinimäärien tuli olla tarpeeksi suuria, jotta niitä voitiin analysoida Western blot –menetelmällä. TRPA1-proteiinin

täytyi antaa ekspressoitua soluissa tarpeeksi pitkään, jotta sitä saatiin tuotettua määritettävissä olevia määriä.

TRPA1:n määrittämiseksi Western blot –menetelmällä on saatavilla joitakin kaupallisia vasta-aineita, joista testattiin muutamaa ja toimivin vasta-aine valittiin TRPA1:n karakterisointiin. Kaupalliset humaanit TRPA1 vasta-aineet Western blot -määrittelyyn ovat usein epäspesifisiä tai ne tunnistavat vain tietyn lajin, kuten rotan tai hiiren TRPA1-proteiineja. Työssä käytettiin TRPA1-vasta-ainetta, joka valmistajan mukaan tunnistaa ainakin rotan TRPA1-proteiinin ja jota on käytetty monissa julkaisuissa myös humaanin TRPA1:n määrittämiseen Western blot –menetelmällä. Valmistajan mukaan vasta-aine tunnistaa TRPA1-proteiinin kooltaan noin 100 kDa, kun taas julkaisuissa on kuvattu vasta-aineen tunnistavan TRPA1-proteiinin kooltaan noin 128 kDa. TRPA1-proteiinin laskennallinen koko on 127,4 kDa (NCBI Ref.Seq NP\_015628.2). Kehittämistehtävän Western blot -määrittelyssä TRPA1-transfektoiduista humaanisoluista vasta-aineen todettiin tunnistavan proteiini kooltaan noin 128 kDa, joten kehittämistehtävässä saatiin aikaan TRPA1-tutkimuksessa tarvittava positiivinen TRPA1-kontrollinäyte Western blot –määrittelyyn. TRPA1:n proteiiniekspressio näytteissä on kuitenkin vähäistä, joten sen detektoimiseksi täytyi käyttää voimakasta detektioagenssia. Western blot –määrittelytulosten perusteella pitkä transfektioaika kuitenkin lisää TRPA1-proteiinin ilmentymistä HEK-293-soluissa.

Kehittämistehtävä toteutettiin osana laajempaa TRPA1-tutkimusta, jossa voidaan hyödyntää kehittämistehtävässä saatuja tuloksia. Positiivisen TRPA1-kontrollinäytteen avulla TRPA1 ekspressiota voidaan tutkia Western blot –määrittelyllä sekä voidaan testata uusia TRPA1 vasta-aineita. TRPA1 ekspressiota on tarkoitus tutkia myös lähetti-RNA tasolla RT-qPCR-menetelmällä. TRPA1:tä ilmentäviä soluja voidaan käyttää TRPA1:n funktion tutkimisessa. Kehittämistehtävän aikana laboratorion käyttöön tehtiin myös työohjeet plasmidi-DNA:n monistamiseen *E. coli* –soluissa sekä plasmidi-DNA:n eristykseen ja analysointiin.

## LÄHTEET

Atoyan, R, Shander, D & Botchkareva, N. V. 2009. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol.* 129, 2312 – 2315.

Bessac, B. F & Jordt, S-E. 2008. Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemosensation and Reflex control. *Physiol.* 23, 360 – 370.

Bessac, B. F, Sivula, M, von Hehn, C. A, Escalera, J, Cohn, L & Jordt, S-E. 2008. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* 118 (5), 1899 – 1910.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 72, 248 – 254.

Caceres, A. I, Brackmann, M, Elia, M. D, Bessac, B, Camino, D, D'Amours, M, Witek, J. S, Fanger, C. M, Chong, J. A, Hayward, N. J, Homer, R. J, Cohn, L, Huang, X, Moran, M. M, & Jordt, S-E. 2009. A Sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106 (22), 9099 – 9104.

Clark, D.P. & Pazdernik, N.J. 2009. *Biotechnology Applying the Genetic Revolution.* Burlington: Elsevier Academic Press.

Dickinson, J & Fowler, S. J. 2002. Quantification of Proteins on Western Blots Using ECL. Teoksessa Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook.* 2. painos. New Jersey. Humana Press Inc.

Gravel, P. 2002. Protein Blotting by the Semidry Method. Teoksessa Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook.* 2. painos. New Jersey. Humana Press Inc.

Kochukov, M. Y, McNearney, T. A, Fu, Y & Westlund, K. N. 2009. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291, 424 - 432.

Kruger, N. J. 2002. The Bradford Method for Protein Quantitation. Teoksessa Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook.* 2. painos. New Jersey. Humana Press Inc.

Latorre, R. 2009. Perspectives on TRP Channel Structure and the TRPA1 Puzzle. *J Gen Physiol.* 133 (3), 227 – 229.

McNamara, C. R, Mandel-Brehm, J, Bautista, D. M, Siemens, J, Deranian, K. L, Zhao, M, Hayward, N. J, Chong, J. A, Julius, D, Moran, M. M & Fanger, C. F. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 (33), 13525 – 13530.

NCBI. Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 [Homo sapiens]. [online] Päivitetty: 16.5.2010. Tulostettu: 20.5.2010. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/116534990?report=genpept>

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. & Peters, J. A. 2007. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol Rev.* Vol 87, 165 – 217.

Origene. 2010. Cloning and selectable vectors. [online] Tulostettu: 18.3.2010. Saatavissa: <http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors.msp>

Parker, A. L, Newman, C, Briggs, S, Seymour, L & Sheridan, P, J. 2003. Lipoplex-mediated transfection and endocytosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* Vol 5. [online] Tallennettu 10.5.2010. Saatavissa: [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM5\\_22/S1462399403006562sup002.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_22/S1462399403006562sup002.htm)

Pedersen, S. F, Owsianik, G & Nilius, B. 2005. TRP channels: An overview. *Cell calcium* 38, 233 – 252.

Pingoud, A, Urbanke, C, Hoggett, J & Jeltsch, A. 2002. *Biochemical Methods A Concise Guide for Students and Researchers.* Weinheim. Wiley-VCH.

Rapley, R. 2009. *Basic Molecular Biology Techniques.* Teoksessa Walker, J. M. & Rapley, R. *Molecular Biology and Biotechnology.* 5. painos. Cambridge. Royal Society of Chemistry.

Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* 3. painos. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sheehan, D. 2009. *Physical Biochemistry. Principles and Applications.* 2.painos. West Sussex. John Wiley & Sons Ltd.

Switzer, R & Garrity, L. 1999. *Western Blot to Identify an Antigen.* Teoksessa Switzer, R & Garrity, L. *Experimental biochemistry.* 3.painos. New York. W. H. Freeman and Company.

Talavera, K, Gees, M, Karashima, Y, Meseguer, V. M, Vanoirbeek, J. A. J, Damann, N, Everaerts, W, Benoit, M, Janssens, A, Vennekens, R, Viana, F, Nemery, B, Nilius, B & Voets, T. 2009. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosc.* 12 (10), 1293 – 1299.

Tan, S. C & Yiap, B. C. 2009. *DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present.* J Biomed and Biotech. 2009, 1 – 10.

Walker, J. 2000. *Electrophoretic techniques.* Teoksessa Wilson, K. & Walker, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry.* 5.painos. Cambridge. Cambridge University Press.

Walker, J. M. 2002. *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins.* Teoksessa Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook.* 2. painos. New Jersey. Humana Press Inc.

Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. & Noguchi, K. 2008, Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131, 1241 - 1251.

Yu, S, Gao, G, Peterson, B. Z & Ouyang, A. 2009. TRPA1 in mast cell activation-induced long-lasting mechanical hypersensitivity of vagal afferent C-fibers in guinea pig esophagus. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 297, 34 – 42)

Zhang, X-F., Chen, J., Faltynek, C. R., Moreland, R. B. & Neelands, T. R. 2008. Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel. *Eur J Neurosci* 27, 605 – 611.